

MICROARRAY-BASED ANALYSIS OF POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS

Publication number: JP2003527867 (T)

Publication date: 2003-09-24

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:










- international: *G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/09; C12Q1/68; G01N37/00; G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/09; C12Q1/68; G01N37/00; (IPC1-7): C12Q1/68; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/09; G01N33/53; G01N37/00*

- European: C12Q1/68D2G

Application number: JP20010569420T 20010320

Priority number(s): US20000191356P 20000322; US20000707366 20001106; WO2001US09165 20010320

Also published as:

 WO0171041 (A2)
 WO0171041 (A3)
 US6376191 (B1)
 US2002086322 (A1)
 EP1301623 (A2)
 CN1426481 (A)
 CN1189573 (C)
 CA2374406 (A1)
 AU5093001 (A)

<< less

Abstract not available for JP 2003527867 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0171041 (A2)**

Solid phase polymerase-mediated amplification approaches using immobilized primers on a microarray are provided for detecting sequence variations in a target polynucleotide. The methods and compositions provided herein are useful for research and clinical applications, particularly for large scale assays of genetic information in biological samples of interest.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

Family list

8 application(s) for: JP2003527867 (T)

Sorting criteria: Priority Date Inventor Applicant Ecla

- 1 **Microarray-based analysis of polynucleotide sequence variations**
 Inventor: YU ZAILIN ; PENG ZAOYUAN (+1) Applicant: MERGEN LTD
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+10)
 Publication AU5093001 (A) - 2001-10-03 Priority Date: 2000-03-22
 info:
- 2 **MICROARRAY-BASED ANALYSIS OF POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS**
 Inventor: HU QIANJIN [US] ; PENG ZAOYUAN Applicant: MERGEN LTD [US]
 [US] (+1)
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+10)
 Publication CA2374406 (A1) - 2001-09-27 Priority Date: 2000-03-22
 info:
- 3 **Microarray-based analysis of polynucleotide sequence variations**
 Inventor: ZAILIN YU [US] ; ZAOYUAN PENG Applicant: MERGEN LTD [US]
 [US] (+1)
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+10)
 Publication CN1426481 (A) - 2003-06-25 Priority Date: 2000-03-22
 info: CN1189573 (C) - 2005-02-16
- 4 **MICROARRAY-BASED ANALYSIS OF POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS**
 Inventor: YU ZAILIN [US] ; PENG ZAOYUAN Applicant: MERGEN LTD [US]
 [US] (+1)
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+10)
 Publication EP1301623 (A2) - 2003-04-16 Priority Date: 2000-03-22
 info:
- 5 **MICROARRAY-BASED ANALYSIS OF POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS**
 Inventor: Applicant:
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+15)
 Publication JP2003527867 (T) - 2003-09-24 Priority Date: 2000-03-22
 info:
- 6 **Microarray-based analysis of polynucleotide sequence variations**
 Inventor: YU ZAILIN [US] ; PENG ZAOYUAN Applicant: MERGEN LTD [US]
 [US] (+1)
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+12)
 Publication US6376191 (B1) - 2002-04-23 Priority Date: 2000-03-22
 info:
- 7 **Microarray-based analysis of polynucleotide sequence variations**
 Inventor: YU ZAILIN [US] ; PENG ZAOYUAN Applicant: YU ZAILIN, ; PENG ZAOYUAN, (+1)
 [US] (+1)
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+13)
 Publication US2002086322 (A1) - 2002-07-04 Priority Date: 2000-03-22
 info:
- 8 **MICROARRAY-BASED ANALYSIS OF POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE VARIATIONS**
 Inventor: YU ZAILIN [US] ; PENG ZAOYUAN Applicant: MERGEN LTD [US] ; YU ZAILIN [US]
 [US] (+1) (+2)
 EC: C12Q1/68D2G IPC: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; (+10)
 Publication WO0171041 (A2) - 2001-09-27 Priority Date: 2000-03-22
 info: WO0171041 (A3) - 2002-07-18

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-527867

(P2003-527867A)

(43) 公表日 平成15年9月24日 (2003.9.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	チーコード* (参考)
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68 A 4 B 0 2 4
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00 A 4 B 0 2 9
	1/34		1/34 Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/09	G 0 1 N	33/53 M
G 0 1 N	33/53		37/00 1 0 2
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2001-569420 (P2001-569420)	(71) 出願人	マージェン リミテッド
(86) (22) 出願日	平成13年3月20日 (2001.3.20)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94577,
(85) 翻訳文提出日	平成13年11月21日 (2001.11.21)		サン リアンドロ, ウィックス ブー
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 1 / 0 9 1 6 5		ルバード 14826
(87) 国際公開番号	W O 0 1 / 0 7 1 0 4 1	(72) 発明者	ユ, ザイリン
(87) 国際公開日	平成13年9月27日 (2001.9.27)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94577,
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 9 1, 3 5 6		サン リアンドロ, ベルブデア ブー
(32) 優先日	平成12年3月22日 (2000.3.22)		ルバード 2374
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(72) 発明者	ベン, ザオユアン
(31) 優先権主張番号	0 9 / 0 7 0, 3 6 6		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94396,
(32) 優先日	平成12年11月6日 (2000.11.6)		パロ アルト, サン ジュード スト
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		リート 865
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド配列改変のマイクロアレイベースの分析

(57) 【要約】

マイクロアレイ上に固定化したプライマーを使用する固相ポリヌクレオチド増幅アプローチが、標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を検出するために提供される。本明細書中で提供される方法および組成物は、研究および臨床用途、特に、目的の生物学的サンプルにおける大スケールの遺伝子情報のアッセイのために有用である。本発明は、従来のハイブリダイゼーションベースのアプローチと比較して、高い感度、優れた精度を有し、そしてより時間のかからない配列改変分析のための新規な方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中の標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を、参照配列と比較して同定するための方法であって、該方法は、以下：

a) オリゴヌクレオチドプライマーの1つ以上の群のアレイを、該サンプルおよびポリメラーゼ媒介ポリヌクレオチド増幅のための試薬を含む反応混合物と接触させる工程であって、ここで、該オリゴヌクレオチドプライマーのアレイは、該オリゴヌクレオチドの5'末端で固相支持体に固定され、さらにここで、該オリゴヌクレオチドプライマーの各群は、該参照配列の特定の領域にわたるように選択され、該アレイ上の個別の領域を占め、そしてプライマーの少なくとも2つのセット：1) 該参照配列に対して正確に相補的である第1のセット；および2) 1つ以上のさらなるセットであり、ここで該1つ以上のさらなるセットの各々は、各さらなるセットが異なる3'末端のヌクレオチドを除いて、該プライマーの第1のセットと同一である、セットを含む、工程；

b) ポリメラーゼ媒介ポリヌクレオチド増幅を実施する工程であって、これにより該標的ポリヌクレオチドは、該標的ポリヌクレオチドに対して正確に相補的な該プライマーのセットから伸長する検出可能な新生ポリヌクレオチドの合成のためのテンプレートとして作用する工程；

c) 対応する固定化プライマーにより、該固相支持体の個別の領域上に捕捉された合成ポリヌクレオチドの存在を検出する工程；ならびに

d) 該固相支持体上の合成ポリヌクレオチドの検出されたパターンに従って、該標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を同定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】 前記反応混合物が、液相プライマーの集団をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記液相プライマーの集団が、万能プライマーを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記万能プライマーが、オリゴ-dTプライマーである、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記万能プライマーが、T7プロモーター、T3プロモーターまたはSP6プロモーターを含むプライマーである、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 前記液相プライマーの集団が、各々特定の配列を有する複数のプライマーを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項7】 前記少なくとも2つの異なる標的ポリヌクレオチドが、異なる生物学的供給源由来である、請求項2に記載の方法。

【請求項8】 前記反応混合物が、前記新生ポリヌクレオチドに組み込まれる検出可能な標識を含み、それにより該新生ポリヌクレオチドが検出可能になる、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記検出可能な標識が、蛍光分子である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記検出可能な標識が、放射標識したdNTP、フルオロ-dNTP、ビオチン化したdNTP、またはジギキシゲニン-dNTPの少なくとも1つである、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 前記検出可能な標識が、前記新生ポリヌクレオチドを結合する分子に結合される、請求項8に記載の方法。

【請求項12】 前記検出可能な標識が、前記新生ポリヌクレオチドに取り込まれる第2の標識を結合する分子に結合される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記アレイが、少なくとも約100～少なくとも約100,000群の固定化オリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記アレイが、少なくとも約1,000群の固定化オリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記アレイが、少なくとも約10,000群の固定化オリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記固相支持体が、ガラス、プラスチック、合成ポリマー、セラミックおよびナイロンからなる群から選択される材料から作製される、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 前記ポリメラーゼが、Taqポリメラーゼ、TthIポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、または任意の他の熱安定性ポリメラーゼである、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を、参照配列と比較して同定するためのキットであって、該キットは、以下：

a) 固相支持体に固定されたオリゴヌクレオチドプライマーの複数の群のアレイであって、ここで、オリゴヌクレオチドプライマーの各群は、該参照配列の特定の領域にわたるように選択されて、該アレイの個別の領域を占め、そしてプライマーの少なくとも4つのセット：1) 該参照配列に対して正確に相補的である第1のセット；および2) プライマーの3つのさらなるセットであり、該さらなるセットの各々は、該3つのセットの各々が3'末端のヌクレオチドを除いて、該プライマーの第1のセットと同一である、セットを含む、アレイ；

b) 該アレイ上のポリメラーゼ媒介ポリヌクレオチド増幅のために適切な試薬；ならびに

c) 該アレイ上で増幅されたポリヌクレオチドを検出するための検出手段、を備える、キット。

【請求項19】 前記検出手段が、増幅反応中に、前記増幅されたポリヌクレオチドに取り込まれる検出可能な標識を含む、請求項18に記載のキット。

【請求項20】 前記検出可能な標識が、蛍光分子である、請求項19に記載のキット。

【請求項21】 前記検出可能な標識が、ビオチン化11-dNTPまたはジゴキシゲニン-dNTPである、請求項19に記載のキット。

【請求項22】 サンプル中の標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を、ポリメラーゼ媒介ポリヌクレオチド増幅により、参照配列と比較して同定するためのアレイであって、該アレイは、以下：

固相支持体の個別の領域上に固定されたオリゴヌクレオチドプライマーの1以上の群であって、ここで、該オリゴヌクレオチドプライマーの群が、該参照配列の特定の領域にわたるように選択され、各群は、以下：

プライマーの少なくとも2つのセットであって、1) 第1のセットは、該参照配列に対して正確に相補的であり、そして2) 1つ以上のさらなるセットの各々は、各さらなるセットで異なる3'末端のヌクレオチドを除いて、該プライマーの第1のセットと同一であり、ヌクレオチドの場合、3'末端で、各さらなる

セットは異なり、その結果、該標的ポリヌクレオチドは、該標的ポリヌクレオチドに対して正確に相補的な該プライマーのセットから伸長する、検出可能な新生ポリヌクレオチドの合成のためのテンプレートとして作用する、セット、を含む、群、を含む、アレイ。

【請求項23】 前記アレイが、少なくとも約100～少なくとも約100,000群の固定化オリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記アレイが、少なくとも約1,000群の固定化オリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記アレイが、少なくとも約10,000群の固定化オリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記固相支持体が、ガラス、プラスチック、合成ポリマー、セラミックおよびナイロンからなる群から選択される材料から作製される、請求項22に記載の方法。

【請求項27】 前記オリゴヌクレオチドプライマーのアレイが、2つ以上の標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を同定するために適切である、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、仮出願番号60/191,356号(2000年3月22日出願)の優先権を主張する。

【0002】

(発明の技術分野)

本発明は一般に、核酸生物学の分野に関する。より詳細には、本発明は、研究、診断および治療用途のため、学的サンプル中のポリヌクレオチド配列改変の高処理の増幅、検出および比較のための方法および組成物を提供する。

【0003】

(発明の背景)

ヒトゲノム解析計画がヒトゲノムの参照配列の完了をアプローチするにつれて、個体の群内、ならびに異なるヒト集団間のDNA配列改変を明らかにすることになります多くの関心が払われている。これらの改変体を同定することは、素因および疾患に対する耐性についての遺伝的根拠のさらなる探索の重要な部分である。これらの配列改変は、複雑な遺伝的パターンおよび強い環境的相互作用を有する疾患および特徴の研究における遺伝マーカーとしてはたらく。

【0004】

現在、集団ベースの遺伝子改変体(例えば、単一ヌクレオチド多型性(SNP))についての大スケールの配列アッセイは、ハイブリダイゼーションベースのオリゴヌクレオチドアレイ(DNAチップ)で行われる。例えば、米国特許第5,837,832号(Cheer)は、プローブの4つのセットのアレイ(この各々は、単一のヌクレオチドについて他とは異なる)を備えるDNAチップを記載する。目的の標的ポリヌクレオチドは、DNAチップにハイブリダイズされ、そして特定の配列改変が、標的ポリヌクレオチドの優先および個別のプローブ位置におけるハイブリダイゼーションの程度に基づいて検出される。同様の技術は、様々なHIV DNA配列の分析のために、米国特許第5,861,242号(Cheer)において使用された。

【0005】

いくつかの問題は、現在のハイブリダイゼーションベースの配列改変アッセイに関連し、それ故、それらの用途を制限している。Hacia (1999) による総説、Nature Genetics Supp. 21:42~47を参照のこと。例えば、ハイブリダイゼーションアッセイの精度は低いままであり、これは、異型接合変異スクリーンにおけるその用途を妨げる。任意の2つの配列に適用される同じ実験的アプローチは、非常に異なる精度を有する結果を生じ得る。ハイブリダイゼーションベースの変異分析の誤った負の誤り率は、改善される必要がある。ハイブリダイゼーションベースの方法論は、1つのヌクレオチドによるハイブリダイゼーションの差違により決定されるため、ハイブリダイゼーション米国特許第雄の配列分析の特異性は、標的ポリヌクレオチドならびにハイブリダイゼーション条件における改変体により劇的に左右され得る。ハイブリダイゼーションベースの変異検出は、標的ポリヌクレオチドがサンプル中に少量存在する場合に、特に無力である。

【0006】

少量の遺伝子物質の検出は、生物学的研究および臨床診断における主な挑戦を意味する。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、ゲノムDNA、一本鎖cDNAまたはmRNAのような、特定のヌクレオチド配列のインビトロ増幅のための、高い感度および特異性を有する強力なツールを提供する。このうちの1つの用途は、例えば、環境的な食品および医用供給源など由来の生物学的サンプル中の標的遺伝子配列を増幅して、このサンプル中に存在する原因生物、病原性生物、損傷生物または指示生物を同定することである。

【0007】

従って、より高い精度およびより優れた感度を有する、配列改変を分析するための方法を開発する必要性が存在する。

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、従来のハイブリダイゼーションベースのアプローチと比較して、高い感度、優れた精度を有し、そしてより時間のかからない配列改変分析のための

新規な方法を提供する。

【0009】

1つの局面において、本発明は、標的ポリヌクレオチドと参照配列との間の配列改変（単一または複数の塩基置換、欠損または挿入、および他のより複雑な改変体を含む）を検出するための方法を提供する。この方法は、固相支持体に固定されたオリゴヌクレオチドプライマーの複数の群のアレイを使用し、このオリゴヌクレオチドプライマーの各群は、参照配列の特定の領域にわたるよう選択され、このアレイの個別の領域を占め、そして以下のプライマーの少なくとも4つのセットを含む：1）参照配列に対して正確に相補的である第1のセット；および2）プライマーの3つのさらなるセットであって、この各々は、3つのセットの各々が異なる3'末端のヌクレオチドを除いて、プライマーの第1のセットと同一である、セット。本発明のアレイは、ポリメラーゼ媒介増幅反応において使用され得、この反応の間、標的ポリヌクレオチドは、この標的ポリヌクレオチドに対して正確に相補的であるプライマーの適切なセットから伸長する、検出可能な新生ポリヌクレオチドの合成のためのテンプレートとして作用する。固定化プライマーは、固相支持体上での標的ポリヌクレオチドの特定の領域の、「インサイチュ」のハイブリダイゼーションおよび増幅を可能にする。各プライマー部位の新生鎖は、増幅の間にこの鎖に組み込まれる標識によって定量的に検出され得る。1つの好ましい実施形態において、本発明を実施するための増幅手段はPCRである。固相支持体上のマイクロアレイは、約100,000群までのプライマーを含み得る。このように、この方法は、約100,000個までの異なる領域の標的ポリヌクレオチドを検出するために有用である。ほとんどの用途の場合、より多くの群が好ましいが、支持体上に存在し得る群の数に下限はないことが明らかである。

【0010】

本発明の1つの実施形態に従って、標的ポリヌクレオチドの非対称的PCRのために固定されたプライマーを単独で使用する。このPCRは、各々の適切なプライマー部位においてその固定相に付着され、そして必要に応じてその鎖へと標識が取り込まれた単一の相補鎖を生じる。本発明の別の実施形態に従って、各々

の標的ポリヌクレオチドについて別のプライマーが溶液中に存在し、その結果、標的ポリヌクレオチドについて両方の鎖は、増強された検出のために、各プライマーにおいて対称的に合成され得、そして保持され得る。

【0011】

本発明を用いて、参照配列に比較したときの、単一の標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を検出し得る。この場合、上記のように本発明のDNAアレイは、参照配列に対応および／または関連する複数群のプライマーを含む。あるいは、本発明を用いて、1または多数の参照配列と比較して複数の標的ポリヌクレオチドにおける配列改変を検出し得る。この標的ポリヌクレオチドは、構造的に関連または無関連であり得る。配列相同性のない複数の標的ポリヌクレオチドが本発明に従って検出されるとき、そのDNAマイクロアレイは、異なる領域へと分割され、ここで、各領域は、特定の参照配列へと指向され、この参照配列は、特定の標的ポリヌクレオチドへと向けられる。複数群のプライマーを、その領域内の固体支持体へと固定する。ここで各群は、その参照配列の特定の領域にわたって選択される。単一の標的ポリヌクレオチドの場合におけるように、各群は、少なくとも以下の4つのプライマーを含む：1) その参照配列に対して正確に相補的である第一のセット；および2) 3つのさらなるセットのプライマーであって、各々が第一のセットのプライマーに同一であるが、最も3'側の末端のヌクレオチドは、3つのセットの各々において異なる、プライマー。

【0012】

本発明はさらに、本明細書において開示されるように、対称的PCRまたは非対称的PCRのいずれかのアプローチを用いて標的ポリヌクレオチドにおける配列の変動を検出するためのキットを提供する。このキットは、PCRプライマーのマイクロアレイならびにPCR反応および検出のために必要な試薬を備える。プライマーのマイクロアレイは、特定の参照配列に向けて改変された約100,000群までのプライマーを含み得る。本発明の1つの実施形態において、そのキットは、PCR反応の間に合成された鎖へと取り込まれ得る、標識されたヌクレオチドを備え得る。

【0013】

(発明を実施するための形態)

本発明は、標的ポリヌクレオチドにおける配列改変の、ハイスループットの様式での、感受性であるがそれでも単純な増幅および検出のための、新規の方法および組成物を提供する。本発明は、ゲノム分析の種々の局面において使用され得る。これは、基礎生物学的研究ならびに医療診断および治療の両方において有用性が見出される。

【0014】

本発明は、PCRおよびポリヌクレオチドアレイ技術の新規組合せに基づく。本発明の基礎的な原理は、テンプレートと対応するプライマーの3'末端との間の単一のヌクレオチドミスマッチが生来の鎖の伸長を防止するに充分であることである。従って、その標的ポリヌクレオチドは、そのプライマーがその標的配列とパーフェクトマッチである部位においてのみ増幅される。プライマーの調製およびPCRの増幅の手順のいくつかの局面は、同時係属中の米国仮出願60/173,618(1999年12月29日出願)および米国特許第5,837,832号(Chееら)において記載されるものに類似する。これらの開示は、本明細書において参考として援用される。

【0015】

(A. 定義)

「ポリヌクレオチド」とは、任意の長さのヌクレオチドの重合形態であり、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかである。この用語は、その分子の一次構造にのみ言及を行う。従って、この用語は、二本鎖および一本鎖のDNAおよびRNAを含む。これはまた、公知の型の改変(例えば、当該分野において公知の標識)、メチル化、「キャップ」、1つ以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログによる置換、例えば、荷電していない連結を有するもののようなヌクレオチド間の改変(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)、付属物部分を含むもの(例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなどを含む)、インターカレーターを含むもの(例えば、アクリジン、ソラーレンなど)、キレーターを含むもの(例えば、金属、放射性金属など)、アルキル化剤を含むもの、改

変された連結を含むもの（例えば、 α アノマー性核酸など）、ならびにそのポリヌクレオチドの改変されていない形態を包含する。

【0016】

本明細書において用いられる用語「プライマー」とは、ポリヌクレオチドに相補的であるプライマー伸長産物の合成が触媒される条件下に置かれる場合、相補鎖に沿ってポリヌクレオチド合成の開始点として作用し得るオリゴヌクレオチドをいう。そのような条件としては、適切な緩衝液中（「緩衝液」には、補因子である置換物、またはpH、イオン強度などに影響を与える置換物が含まれる）で、かつ適切な温度での、4つの異なるヌクレオチド三リン酸またはヌクレオシドアナログならびにDNAポリメラーゼおよび／または逆転写酵素のような重合化のための1つ以上の薬剤の存在が挙げられる。プライマーは、ポリメラーゼのための薬剤の存在下で伸長産物の合成を刺激するに十分に長い時間であればならない。代表的なプライマーは、その標的配列に実質的に相補的である少なくとも約5ヌクレオチド長を含むが、いくらかより長いプライマーが好ましい。通常プライマーは約15～26ヌクレオチドを含むが、より長いプライマー（35ヌクレオチドまで）もまた使用され得る。

【0017】

プライマーは常に、その標的配列に実質的に相補的である配列を含む。この配列は、増幅されるべき特異的配列であり、そしてプライマーがアニールし得る配列である。プライマーはまた、必要に応じてプロモーター配列を含み得る。用語「プロモーター配列」は、認識された配列に結合し、そしてRNA転写物が産生される転写のプロセスを開始するRNAポリメラーゼによって特異的に認識される核酸配列の本鎖を規定する。原則的に、その開始配列を認識し得る公知かつ利用可能なポリメラーゼが存在する任意のプロモーター配列が使用され得る。公知かつ有用なプロモーターは、特定のバクテリオファージポリメラーゼ（例えば、バクテリオファージT3、T7またはSP6）によって認識されるプロモーターである。

【0018】

本明細書において用いられる用語「タグ」、「配列タグ」または「プライマー

タグ配列」とは、そのようなタグを中に有するポリヌクレオチドのパッチを同定することを行う、特定の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドをいう。同じ生物学的供給源からのポリヌクレオチドは、特定の配列タグに共有結合的にタグ付けされ、その結果、続いての分析において、そのポリヌクレオチドは、その供給源に従って同定され得る。その配列タグはまた、核酸増幅反応についてのプライマーとして役立つ。

【0019】

「マイクロアレイ」とは、固体支持体に表面上に形成された、各々が規定された面積を有する好ましくは別個の領域の直線状または二次元のアレイである。マイクロアレイ上のその別個の領域の密度は、単一の固相支持体の表面において検出されるべき標的ポリヌクレオチドの総数によって決定され、好ましくは、少なくとも約 $50/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは少なくとも約 $100/\text{cm}^2$ であり、皿により好ましくは少なくとも約 $500/\text{cm}^2$ であり、そしてなおより好ましくは少なくとも約 $1000/\text{cm}^2$ である。本明細書において使用される「DNAマイクロアレイ」とは、標的ポリヌクレオチドを増幅またはクローニングするために用いられるチップまたは他の表面上に配置されるオリゴヌクレオチドプライマーのアレイである。そのアレイにおける各々の特定の群のプライマーの位置が既知であることから、その標的ポリヌクレオチドの正体は、そのマイクロアレイにおける特定の位置へのそれらの結合に基づいて判定され得る。

【0020】

「リンカー」とは、制限部位を含む合成オリゴデオキシヌクレオチドである。リンカーをDNAフラグメントの末端に平滑末端連結して、ベクター分子中にそのフラグメントの続いてのクローニングにおいて使用され得る制限部位を作製し得る。

【0021】

用語「標識」とは、アッセイサンプルにおける標的ポリヌクレオチドの存在の指標となる検出可能なシグナルを生成し得る組成物をいう。適切な標識としては、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光部分、磁性粒子、生物発光部分などが挙げられる。それ自体、標識は、分光法、光化学

、生化学、免疫化学、電気、光学、または化学的な手段によって検出され得る任意の組成物である。

【0022】

用語「支持体」とは、簡便な支持体をいう（例えば、ビーズ、粒子、ディップスティック、繊維、フィルター、膜およびシランもしくはシリケート支持体（例えばガラススライド））。

【0023】

用語「増幅する」とは、広義に用いられ、増幅産物を作製することを意味する。増幅産物には、例えば、さらなる標的分子または標的様分子またはその標的分子に相補的な分子が含まれ得る。この分子は、そのサンプルにおけるその標的分子の存在によって作製され得る。その標的が核酸である場合、増幅産物は、DNAまたはRNAのポリメラーゼあるいは逆転写酵素を用いて酵素的に作製され得る。

【0024】

本明細書において使用される「生物学的サンプル」とは、固体から単離された組織または流体のサンプルをいう。これには、以下が挙げられるがそれらに限定されない：血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚の体外分泌物、呼吸管、腸管、生殖管、涙液、唾液、乳汁、細胞（血球を含むがそれらに限定されない）、腫瘍、器官、およびまたインビトロ細胞培養物成分のサンプル。

【0025】

本明細書において使用される用語「生物学的供給源」とは、標的ポリヌクレオチドが由来する供給源をいう。その供給源は、上記の任意の形態の「サンプル」であり得、これには、以下が挙げられるがそれらに限定されない：細胞、組織または流体。「異なる生物学的供給源」とは、同じ個体の異なる細胞／組織／器官、または同じ種の異なる個体の細胞／組織／器官、または異なる種の細胞／組織／器官をいい得る。

【0026】

(B. 参照配列の選択)

本発明を用いて特定の参照配列と標的ポリヌクレオチドとを比較し得る。その

標的ポリヌクレオチドは、その参照配列自体またはその改変体のいずれかであり得る。参照配列として選択される配列は、任意の生物学的供給源由来であり得、以下が挙げられるがそれらに限定されない：細胞、組織または流体。この参照配列およびその標的ポリヌクレオチドは、異なる供給源由来であり得る。好ましくは、その参照配列およびその標的ポリヌクレオチドについての供給源は、同じ種の異なる個体に由来するか、または同じ種の異なる集団に由来する。

【0027】

参照配列は、その特定の生物学的供給源に由来する目的の遺伝子の少なくとも一部を含み得る。好ましくは、本発明のための参照配列は、少なくとも1つの特定のヌクレオチド位置が遺伝子の特定の機能に関連することが知られる領域を網羅する。例えば、その位置は、酵素をコードする遺伝子の活性部位であり得、そしてその位置の点変異は、その酵素活性の喪失を生じる。その位置は、細胞ゲノムにおける薬物耐性部位であり得、そこでは、その野生型遺伝子についてのヌクレオチド置換は、特定の抗生物質に対する耐性を生じる。その参照配列はまた、その生物学的供給源のゲノム全体を含み得る。例えば、1つのHIV株のゲノム全体が異なるHIV株の配列改変の同定のために参照配列として使用され得る。

【0028】

その参照配列は、特定のヒト集団の特定の個々の代表に由来し得、そしてこれを使用して、異なる集団のSNPを同定し得る。異なるヒト集団は、異なる性別、年齢または人種由来であり得、異なる地理的地域に由来し得、そして異なる家系に由来し得る。好ましくは、その参照配列は、その集団の特定の識別可能な特性または表現型を表すように選択される。同定された配列改変およびこれらの表現形特性の関連についてのさらなる研究は、集団の遺伝子連鎖における洞察または特定の疾患の遺伝学的基礎を提供するはずである。

【0029】

この参照配列は、任意の長さであり得、通常、約5、10、20、50、100、500、1000、5000または10,000の塩基の間であり得る。その参照配列は、野生型遺伝子と比較されるいくつかの配列改変自体を、その改変が本発明の目的について目的の領域の外側にある限り含み得る。その参照配列は

、任意の配列供給源から入手され得る（例えば、公にアクセス可能であるかまたは市販されているかのいずれかである配列データベース）。

【0030】

（C. オリゴヌクレオチドプライマーのアレイの設計）

（1. プライマーの選択）

本発明は、固定され、そして別個の群のオリゴヌクレオチドプライマーを含む調製された個体支持体を提供する。各プライマー群は、その参照配列内の特定の領域に対応し、そしてプライマーの少なくとも4つのセットを含み、ここで、第一のセットは、その参照配列の特定の領域に正確に相補的であり、そして他の3つのセットは、最も3'末端のヌクレオチドについて以外は第一のセットと同一である。例えば、その参照配列におけるAヌクレオチドについて、第一のセットに由来するその対応するプライマーは、その最も3'末端においてTを有し、他方、さらなる3つのプライマーセットは、それらの最も3'末端においてA、CまたはGという異なるヌクレオチドを各々のセットにおいて有する。その4つのプライマーのセットの長さは同じであることが好ましいが必要ではない。そのプライマーは、例えば、標準的なPCRプライマー選択プログラム（例えば、Massachusetts Institute of Technology (MIT) からのPrimer3）を使用して選択または設計され得る。

【0031】

固相支持体は、約5～約100の平方 μm の面積を提供し得る。その上では、約100,000群のプライマーまでが所定のパターンに従って別個の領域に固定され得る。調製される固体支持体は、その支持体における任意の所定の位置においてプライマーまたはプライマー対の配列の、関連する書面または電子的な記録を有し得る。そして従って、その支持体における、増幅される標的的位置もまた同定され得る。

【0032】

その参照配列の特定の領域に対応する各々の群内のプライマーの数は、そのマイクロアレイにおける続いて計画される増幅反応の必要性によって決定および限定され得る。従って、例えば、標的テンプレートポリヌクレオチド分子の反応容

量および期待される数ならびにPCRの提唱されるサイクル数が具体的に与えられ、そのマイクロアレイにおける特定の部位でPCRを行うために必要とみなされるプライマーの数は、どれだけのオリゴヌクレオチドプライマーコピーをその支持体における各々の位置での群として適用して首尾よい反応を確実にすることを正確に決定することを支援する。好ましくはプライマーの量（すなわち、プライマー分子の数またはプライマー濃度）は、所定の固体支持体において各々提供される位置とほぼ同じである（例えば、1000～10,000を有するDNAマイクロアレイフォーマットにおいて、約100,000の領域までの標的ポリヌクレオチドを増幅または検出するための、約100,000までの群のプライマー）。

【0033】

その固体支持体は、検出されるべきポリヌクレオチドに基づいて特定の適用のためのプライマー配列を用いて調製され得る。そのオリゴヌクレオチドプライマーは、特に、増幅されるべき標的ポリヌクレオチドの配列および量を考慮して、特定のPCRについて適切な任意の長さのものであり得る。例として、そのプライマーは、約4～約30のヌクレオチド長であり得る。

【0034】

本発明の核酸プライマーは、核酸塩基の少量の欠失、付加、および／または置換を、このような改変が有意な程度までに得られる取量もしくは産物に負に影響を及ぼさない程度まで、含有し得ることが理解される。

【0035】

オリゴヌクレオチドプライマーは、核酸において通常見出される天然に存在するヘテロ環状塩基（ウラシル、シトシン、チミン、アデニン、およびグアニン）、ならびに改変された塩基および塩基アナログを含有し得る。プライマーの標的配列へのハイブリダイゼーションに適合性である任意の改変された塩基または塩基アナログは、本発明の実施において有用である。

【0036】

そのプライマーの糖またはグリコシド部分は、デオキシリボース、リボース、および／またはこれらの糖の改変された形態（例えば、2'-O-アルキルリボ

ース)を含み得る。好ましい実施形態において、糖部分は、2'-デオキシリボースであるが;しかし、標的配列にハイブリダイズするそのプライマーの能力と適合可能なその任意の糖部分が使用され得る。

【0037】

1つの実施形態において、そのプライマーのヌクレオシド単位は、当該分野で周知のように、ホスホジエステル骨格によって連結されている。さらなる実施形態において、ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルファメート(例えば、米国特許第5,470,967号)およびポリアミド(すなわち、ペプチド核酸)を含むがこれらに限定されないプライマーの特異的ハイブリダイゼーションと適合性である当業者に公知の任意の連結を含み得る。ペプチド核酸は、Nielsenら(1991) *Science* 254:1497-1500、米国特許第5,714,331号およびNielsen(1999) *Curr. Opin., Biotechnol.* 10:71-75に記載される。

【0038】

特定の実施形態において、そのプライマーは、キメラ分子であり得る。すなわち、塩基または糖サブユニットの1つ以上のタイプを含み得、および/またはその連結は、同じプライマー内の1つ以上のタイプのものであり得る。

【0039】

そのプライマーは、当該分野で公知のように、例えば、インターカレーターおよび/または微小な溝バインダー(groove binder)のような、その標的配列へのハイブリダイゼーションを容易にするための部分を含有し得る。

【0040】

プライマーにおける塩基、糖、およびヌクレオシド間骨格の改変、ならびに任意のペンドント基の存在は、配列特異的にその標的配列へ結合するそのプライマーの能力と適合性である。多数の構造的改変は、公知のものも開発されるべきもの、いずれも、これらの限界内で可能である。さらに、プライマーを形成する種々のヘテロ環状塩基、糖、ヌクレオシド、およびヌクレオチドを調製するための合成法は、ならびに特異的な所定の配列のオリゴヌクレオチドの調製は、当該

分野で充分に開発されており、そして公知である。オリゴヌクレオチド合成のための好ましい方法は、米国特許第5,419,966号の教示を取り込む。

【0041】

オリゴヌクレオチドプライマーは、特定のPCRまたは引き続く操作（例えば、増幅された標的ポリヌクレオチドの単離）を補助し容易にする任意の特別な付加的部分または配列によって設計され得る。例えば、プライマーは、標的配列に相補的である配列に加えて、配列を含み得る。このような配列は、通常、プライマーにおいて標的相補配列の上流（すなわち、5'側）である。例えば、1つ以上の制限酵素認識部位（いわゆる「リンカー」または「アダプター」）を含む配列は、標的相補的配列の上流のプライマーに存在する場合、増幅産物のクローニングおよび引き続く操作を容易にする。プライマーに含めるために他の有用な配列には、配列決定プライマーに相補的なもの、およびバクテリオファージRNAポリメラーゼ（例えば、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、および/またはSP6 RNAポリメラーゼ）についてのプロモーターを特定するものが含まれる。

【0042】

本発明の1つの局面において、マイクロアレイプライマーは、標的ポリヌクレオチドの目的の全体領域をカバーするためのタイリング方法によって規定される。例えば、プライマーの第1のグループは、そこの各プライマーの配列が、目的の領域のほとんどの5'部分に対応するように設計される；プライマーの第二のグループは、第1のグループから1ヌクレオチドだけその領域の3'末端側に「シフト」した配列を有する；そしてプライマーの第3のグループは、第二のグループから1ヌクレオチドだけその領域の3'側に「シフト」した配列を有するなどである。次いで、理論上、プライマーのグループの数は、目的の領域のヌクレオチドの数に等しい。もちろん、その領域の特定の部分に対応するプライマーの各々のグループ内において、上記のように4つの異なる3'末端を有する少なくとも4セットのプライマーが存在する。複数の標的ポリヌクレオチドが本発明に従って検出されるべき場合、特定の標的ポリヌクレオチドに対応する各プライマーグループは、マイクロアレイの明確な領域に存在する。

【0043】

(2. 固相支持体)

本発明の固相支持体は、任意の固体の材料であって、ヌクレオチドハイブリダイゼーションおよび合成を支持するのに適切な構造を有するものであり得る。好ましくは、その固相支持体は、プライマーが、その上で固定化され得てしてPCR反応が行われる少なくとも1つの実質的に堅い表面を含む。その固相支持体は、例えば、ガラス、合成プライマー、プラスチック、堅いノンメッシュのナイロン、またはセラミックからできているものであり得る。他の適切な固相支持体材料は、当業者に公知であり、そして容易に入手可能である。固相支持体のサイズは、DNAマイクロアレイ技術に有用な、任意の標準的なマイクロアレイのサイズのものであり得、そしてそのサイズは、本発明の反応を行うために使用される特定のマシンに適合するように作製され得る。オリゴヌクレオチドを固定化するための固相支持体の誘導体化のための方法および材料は、当業者に公知であり、そして、例えば、米国特許第5,919,523号に記載され、その開示は、本明細書に参考として援用される。

【0044】

固相支持体は、流体を含有する容器の一部においてまたは一部として提供され得る。例えば、固相支持体は、固相支持体の端に沿ってシールを作製する側面を有するチャンバに配置され、そのようにして、その支持体上にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含み得る。特定の実施例において、そのチャンバは、長方形の支持体の片側の各側に壁を有し、そのPCR混合物がその支持体上に残ることを確実にし、そしてその表面全体がプライマーを提供するために有用であるようにする。

【0045】

(3. プライマー固定化)

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、固相支持体上の特定の位置にそのオリゴヌクレオチドを固定、固定化、提供、および/または適用するための任意の利用可能な手段を使用して、固相支持体の表面に、固定され、固定化され、提供され、および/または適用される。例えば、フォトリトグラフィー(Affy

metrix, Santa Clara, CA) は、米国特許第5,919,523号、米国特許第5,837,832号、米国特許第5,831,070号および米国特許第5,770,722号（これらは、本明細書に参考として援用される）に記載されるように、そのオリゴヌクレオチドプライマーを、チップまたは固相支持体上の特定の位置で適用するために使用され得る。そのオリゴヌクレオチドプライマーはまた、BrownおよびShalon、米国特許第5,807,522号（1998）に記載されるように、固相支持体に適用され得る。さらに、そのプライマーは、ロボットシステム（例えば、Genetic MicroSystems (Woburn, MA), GeneMachines (San Carlos, CA)、またはCartesian Technologies (Irvine, CA) によって製造されるもの）固相支持体に適用され得る。

【0046】

（D. 標的ポリヌクレオチドにおける配列改変の検出）

本発明の1つの局面において、1つの生物学的サンプルからの標的ポリヌクレオチドの固相増幅が行われ、そこで、オリゴヌクレオチドプライマーの複数のグループは、固相支持体上に固定化される。好ましい実施形態において、グループ内のプライマーは、標的ポリヌクレオチドの規定される配列に配列が同一であり、そして相補的であって、その標的ポリヌクレオチドに適切な条件下でハイブリダイズし得、そして核酸合成（すなわち、鎖伸長または延長）のために開始プライマーとして適切である少なくとも第1のセットのプライマーを含む。その参照配列の特定の領域をカバーする選択されたプライマーは、1つのグループとして、明確な位置に固相支持体上に固定される。好ましくは、そのグループ間の距離は、増幅された産物を検出するために使用されるための検出手段の分解能よりも大きい。好ましい実施形態において、そのプライマーは、固定化され、マイクロアレイまたはチップを形成し、これは自動化されたプロセッシングによって処理または分析され得る。固定化されたプライマーは、核酸増幅手段のために適切な条件下で標的ポリヌクレオチドの固相増幅のために使用される。

【0047】

本発明の1つの局面に従って、最初の標的ポリヌクレオチドは、センス鎖（「ポジティブ鎖」）および相補鎖（「ネガティブ鎖」）との二本鎖形態である。増幅を行う前に、その標的ポリヌクレオチドは、変性され（例えば、熱変性）、それにより、2つの鎖が変性されて、反応溶液中で分離される。好ましくは、本発明において使用されるプライマーは、標的ポリヌクレオチドの予想される濃度に対して大量のモル濃度過剰であり、その2つの標的ポリヌクレオチド鎖の再変性に逆作用する。あるいは、その最初の標的ポリヌクレオチドは、一本鎖DNAまたはRNAのような一本鎖である。

【0048】

本発明の好ましい実施形態において、核酸増幅は、ポリメラーゼによって媒介される。さらに好ましくは、その増幅は、PCR反応にとって適切な条件下で行われる。当業者に理解されるように、PCR反応は、一般的に、種々の反応温度でのアニーリング-伸長-変性工程の複数のサイクルを含み、この間に複数のコピーの新生鎖が、鋳型としての最初の標的ポリヌクレオチドに基づいて合成される。その結果として、最初の標的配列は、そのPCR反応の条件および制限に依存して、直線的にかまたは対数的にのいずれかで、「増幅」される。

【0049】

本発明に従うPCR反応の間に、固定化プライマーのアレイは、その標的ポリヌクレオチドが二本鎖形態である場合には変性の後に、反応混合物中で標的ポリヌクレオチドと接触される。アニーリングに適切な条件下で、一本鎖標的ポリヌクレオチドは、一本鎖標的ポリヌクレオチド内の規定された配列領域に相補的な配列を含有する固定化一本鎖プライマーにハイブリダイズされる。鎖伸長に適切な条件下で（DNAポリメラーゼおよび遊離のヌクレオチドdNTPの存在を含むがこれに限定されない）、各標的ポリヌクレオチド鎖は、新生相補鎖の合成のための開始テンプレートとして作用し、これは、そのアニーリングされるプライマーの3'ヒドロキシからプライムされ、そしてその標的テンプレートの5'末端に向かって伸長する。鎖伸長の完了に続いて、その反応条件を変化させて変性させ、その間に、その標的鎖および新生鎖を分離して、その標的鎖がサンプル溶液中に放出され、その新生鎖が、固定化プライマーを介してその固相に維持され

るようにする。

【0050】

本発明を実施するにおいて、その固定化単一プライマーは、単独でか、または、その新生固定化鎖の3'末端においてその配列に相補的なその反応溶液中のプライマーと、組み合わせて使用され得る。さらに、その溶液相プライマーは、全ての標的ポリヌクレオチドを増幅し得るユニバーサルプライマーか、または、特定のプライマーのプールのいずれかであり得、その各々は、特定の標的配列に特異的である。

【0051】

本発明の1つの実施形態において、使用される溶液相プライマーはない。したがって、上記の最初の増幅プライマー反応は、各プライマー部位で固相支持体に固定された新生鎖を、変性工程が伸長の後に導入されるか否かに依存して、一本鎖として、または最初の標的ポリヌクレオチド鎖にアニーリングされてのいずれかで、産生する。これらの新生鎖の存在は、以下にさらに記載する適切な検出手段によって検出され得る。

【0052】

本発明の別の局面において、溶液相プライマーは、複数の標的ポリヌクレオチドの増幅のために、固相固定化プライマーと組み合わせて使用される。最初の増幅反応に引き続いて、増幅反応の別のラウンドが行われ、その間に、その3'末端で溶液相プライマーと相補的な以前に形成された新生鎖が、その溶液相プライマーにアニーリングし、そして標的ポリヌクレオチドに実質的に同一である第二の新生鎖の引き続く合成のためにテンプレートとして作用する。その結果として、二本鎖新生ポリヌクレオチドが形成され得、そして各プライマー部位で固相支持体に固定される。

【0053】

本発明の目的のために、標的ポリヌクレオチドは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、またはRNAであり得る。標的ポリヌクレオチドの例には、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、増幅されたDNA、およびウイルスRNAが含まれるが、これらに限定されない。二本鎖標的ポ

リヌクレオチドは、増幅反応の開始時に変性され、一本鎖テンプレートを提供する。

【0054】

mRNA 標的ポリヌクレオチドは、逆転写によって媒介される増幅のためのテンプレートとして直接使用され得る。各固定化されたプライマー部位から始まった鎖伸長の完了に続いて、そのハイブリダイズしたRNAテンプレート鎖は、例えば、RNAse Hによって破壊され得、両相支持体に固定された新生相補鎖DNA鎖を残す。第二のプライマー（特異的またはユニバーサルのいずれか）が溶液相に存在する場合には、第1の新生cDNA鎖が別の新生鎖の合成のためのテンプレートとして作用し、それによって、二本鎖新生DNA分子が、各固定化されたプライマー部位に形成されるか、または2つの固定化プライマーを結合する。

【0055】

あるいは、サンプル中のmRNA標的ポリヌクレオチドは、まず相補DNAに逆転写され、これは、次いで最初のテンプレートとして、本発明の固相PCR反応のために作用する。逆転写は、本発明に従うPCR増幅反応のための溶液相においてユニバーサルプライマーとしてもまた使用され得る例えば、ポリTユニバーサルプライマーから開始され得る。ポリTで開始されたcDNA産物は、その3'末端で、固相支持体に固定化された特異的なプライマーにアニーリングし、そしてその3'末端にポリA配列を有する新生相補鎖の引き続く合成のためのテンプレートとして作用する。変性工程に続いて、単一の固定化新生鎖は、その溶液相にてポリTユニバーサルプライマーにハイブリダイズし得、そして引き続くラウンドのPCR増幅および固相支持体に固定された二本鎖新生ポリヌクレオチドの形成のためのテンプレートとして作用する。

【0056】

本発明の複数標的ポリヌクレオチドは、単一の生物学的供給源に由来し得るか、または、異なる種または組織のような複数の生物学的供給源に由来し得る。例えば、健康な個体から単離された標的ポリヌクレオチドの集団は、1つのPCR反応において、目的の疾患を有する患者から単離された標的ポリヌクレオチドの

別の集団と、先に詳細に記載したような当該分野で公知の検出方法によって、その2つの供給源の増幅産物を区別することができるような条件下で、混合され得る。したがって、本発明は、標的ポリヌクレオチドの種間の比較分析のために使用され得る。

【0057】

(5. PCR反応)

本発明の実施において、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を誘導するのに必要な試薬とともに混合された適切な標的ポリヌクレオチドを含む反応混合物を、固体支持体上で、各々の固定されたプライマー対または単一のプライマー集団と接触させて配置する。この適切な標的ポリヌクレオチドは、二本鎖DNA、RNA鋳型の逆転写により生成された一本鎖cDNA、またはmRNA集団であり得る。この反応混合物は、標的鎖に相補的なポリヌクレオチド鎖の合成を促進するための酵素(例えば、ポリメラーゼ)を含む。適切なポリメラーゼとしては、Taq DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、およびPfu DNAポリメラーゼのような熱安定性ポリメラーゼ酵素が挙げられる。この反応混合物はまた、ポリメラーゼ連鎖反応の間、新生(未完成)の鎖に組み込まれ得る標識分子を含み、それにより増幅された産物はPCR後に、固体支持体上で検出され得る。この標識は、当該分野で周知の方法に従って、直接または間接的に検出され得る。直接検出に適切な標識は、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッドまたはローダミンのような任意の蛍光分子であり得る。直接検出を容易にする分子(例えば、ビオチンまたはジゴキシゲニン)がまた、PCRの間に、新生鎖に組み込まれ得る。ビオチンは、標識されたストレプトアビジンまたは標識された抗ビオチン抗体への結合により、引き続いて検出され得る。同様に、組み込まれたジゴキシゲニンは、標識抗ジゴキシゲニン抗体または非標識の抗ジゴキシゲニン抗体により検出され得、そして非標識の抗ジゴキシゲニン抗体は、標識された抗-抗ジゴキシゲニン抗体結合により検出され得る。

【0058】

PCRを誘導するための試薬がマイクロアレイ上で固定されたプライマーに接

触した後、このマイクロアレイは、例えば、インサイチュPCR機のような自動システムを用いて、PCRの実行を容易にする条件に置かれる。PCR手順のための反応条件は、インサイチュPCR機マニュアルに推奨されるように行われ得、そして、用いられている鋳型の性質または、プライマーおよび鋳型ハイブリダイゼーションで予期される任意の他の困難性を考慮して適切に変更され得る。温度およびサイクル数は、プライマー選択および鋳型配列、ならびに任意の他の関連因子を考慮して、推奨されるようにかつ適切に選択され得る。マイクロアレイ上のインサイチュ型のPCR反応は、以下に記載のように本質的に行われ得る：例えば、Embretsonら、Nature 362:359~362 (1993)；Gosdenら、BioTechniques 15(1):78~80 (1993)；Henifordら Nuc. Acid Res. 21(14):3159~3166 (1993)；Longら、Histochemistry 99:151~162 (1993)；Nuovoら、PCR Methods and Applications 2(4):305~312 (1993)；Pattersonら、Science 260:976~979 (1993)。

【0059】

(6. 標識および検出)

本発明のPCR方法は、サンプルにおける複数の標的ポリヌクレオチドの検出を提供する。適切な標識化試薬の存在下でPCRを完了した後、増幅した標的ポリヌクレオチドおよび標識した標的ポリヌクレオチドが、マイクロアレイ上のもとのプライマー位置の各々で検出され得る。増幅した標的ポリヌクレオチドまたは標識した標的ポリヌクレオチドを検出することは、標識配列を検出するのに用いられる標準的方法により行われ得る。この方法は、例えば、増幅されたかまたは新しく合成されたDNA鎖中に組み込まれた標識を検出する工程を含む。従って、例えば、蛍光標識または放射性標識は、直接検出され得る。他の標識化技術は、ビオチンまたはジゴキシゲニンのような標識（鎖の合成の間、DNAに組み込まれる）が、標識されているか、または標識された分子自体に結合し得るかのいずれかの、抗体または他の結合分子（例えば、ストレプトアビジン）によ

り検出されることを必要とし得る。例えば、標識された分子は、蛍光分子（例えば、蛍光イソチオシアネート、テキサスレッド（Texas red）およびローダミン）または酵素的に活性化可能な分子のいずれかに結合体化された抗ストレプトアビジン抗体または抗ジゴキシゲニン抗体であり得る。新しく合成された分子上のどんな標識が、そして標識がいつDNAに関しまたはDNAに結合する分子（またはDNAに結合する分子に結合する分子）に結合体化されても、標識（例えば、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識、または比色定量標識）は、標識または特定の標識を検出するための他の適切な手段に依存して、レーザースキャナーもしくはCCDカメラ、またはX線フィルムにより検出され得る。

【0060】

標的ポリヌクレオチドは、標識されたヌクレオチド（例えば、直接標識化のためのdNTP-蛍光標識）を用いて検出され得る；dNTP-ビオチンまたはdNTP-ジゴキシゲニン（直接標識化のため）は、PCRの間に、増幅するDNAに組み込まれる。間接的に標識されたDNAについては、蛍光または他の酵素結合体化ストレプトアビジンまたは抗ジゴキシゲニン抗体により検出が実行される。PCR方法は、ポリヌクレオチド標的に対する新しく合成された相補体中に組み込まれた標識を検出することにより、ポリヌクレオチドの検出を行う。この目的のために、合成されるのとおなじようにDNAに組み込まれ得る任意の標識が、用いられ得る。この標識としては、例えば、上記のような、そして当該分野で公知のフルオロ-dNTP、ビオチン-dNTP、またはジゴキシゲニン-dNTPが挙げられる。溶液中で1つ以上のユニバーサルプライマーを用いて実行されるPCR増幅により、ユニバーサルプライマーを検出することによる固体支持体上の位置での増幅標的を検出するためのオプションが提供される。従って、1つ以上のユニバーサルプライマーが用いられる場合、異なる供給源からの標的鎖は、固体支持体上で示差的に検出され得る。

【0061】

示差的な発現系において、異なる生物学的供給源に由来する増幅産物は、その起源に基づき、増幅する鎖を示差的に標識することにより検出され得る。この方法は、「C. Comparing Differential Expressio

n of Genes from Different Biological Sources」の節に記載されている。1つの局面において、本明細書において用いられる検出方法は、単一の供給源の標的についての検出方法とは異なる。すなわち、増幅の間に新生鎖に組み込むのではなく、異なる標識（例えば、赤い色素および緑の色素）を、溶液中のプライマータグに予め組み込む。あるいは、示差的な発現比較についての全体的感受性を増強するように、第3の標識をまた、異なる標識に加えて、増幅の間に新生鎖に組み込み得る。

【0062】

（7. 検出キット）

本発明は、本発明の方法を実行するためのキットを提供する。このキットは、例えば、複数の標的ポリヌクレオチドを検出するための物質および試薬（さもないければ、固体支持体上での検出が困難である）を含み得る。このキットは、例えば、固体支持体、特定のセットの標的ポリヌクレオチドについてのオリゴヌクレオチドプライマー、ポリメラーゼ連鎖反応の試薬および成分（例えば、DNA合成のための酵素）、標識物質、ならびに洗浄のための他の緩衝液および試薬を含み得る。このキットはまた、固体支持体上で特定の標的を増幅するためのキットの使用のための説明書（指示書）を含み得る。キットが、例えば、標的ポリヌクレオチドの特定のセットを増幅するため、固体支持体上に既に固定された1セットのプライマーを有する調製された固体支持体を含む場合、このような調製された固体支持体の設計および構築物は上記されている。このような固体支持体は、カスタマーが検出を望む標的ポリヌクレオチドに依存して、個々のキットについてカスタムメイドされ得る。このキットはまた、例えば、インサイチュ型のPCR手順または固相型のPCR手順（ここで、支持体は、インサイチュ型PCR機を用いてPCR増幅され得る）を用いて、固体支持体上でPCRを実行するために必要な試薬を含む。この支持体は、PCRのための試薬と接触され得る。可能性として複数の標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを、反応の前にPCR試薬混合物に添加する。このPCR試薬は、通常のPCR緩衝液、熱安定性ポリメラーゼ（例えば、Taq DNAポリメラーゼ）、ヌクレオチド（例えば、dNTP）、および他の成分および標識分子（例えば、上記のような直接標識または間

接標識のための)を含む。この固体支持体は、固体支持体上の指定の位置に、添付されたプライマーを提供する。PCRを実行するため、固定されたプライマーを有する支持体を、反応混合物中で、PCRを実行するための試薬および標的ポリヌクレオチド鋳型と接触させ、そしてPCR(例えば、インサイチュ型PCRまたは固相型PCR)条件に供する。このキットの使用のための指示書は、例えば、上記の方法の記載において示されたような手順についてのこのような詳細を有し得る。このキットは、固定プライマー単独で用いて、あるいは、溶液相プライマーと一緒に用いて、PCR増幅方法の実行を助けるように構築され得る。

【0063】

(D. 複数の標的ポリヌクレオチドの高生産性アッセイ)

上記の増幅方法は、単一の固相支持体上の複数の標的ポリヌクレオチドの高生産性アッセイのために使用され得る。複数の群のプライマー(単一もしくは対の形態のいずれかにおいて)が、予め決定されたパターンでマイクロアレイを形成するように固相支持体上に固定される。各群のプライマーは、特定の標的ポリヌクレオチドに対応し、そしてそのマイクロアレイ内で別々の位置を占める。複数の標的ポリヌクレオチドを含むか、または含むと思われるサンプルが、上記のように、PCR反応に適した反応条件下でマイクロアレイと接触する場合、各標的ポリヌクレオチドは増幅されて、そして別個の位置にて、そこに固定された対応するプライマーを有するマイクロアレイに添付される。

【0064】

本発明に従って、潜在的な標的ポリヌクレオチドの数は、低密度マイクロアレイを複製し、そして分析するために利用可能な技術によってのみ制限される。例えば、公知の技術を使用して、固体支持体上の別々の位置に約100,000までの異なる群のプライマー対を提供し、そしてその支持体を少なくとも1つの標的ポリヌクレオチド(プライマーは、この標的ポリヌクレオチドを検出するように設計されている)のコピーを含むPCR溶液およびサンプルと接触させることによって、約100,000ポリヌクレオチドまでが、単一固体支持体上で分析され得る。

【0065】

(実施例)

(実施例1. マイクロアレイ上のG3PDF遺伝子のPCR検出)

ヒトG3PDHをコードする遺伝子を、対称的PCR（両方のメンバーのプライマー対がその支持体上に固定される）によってか、または非対称的PCR（プライマー対の1つのメンバーが固定され、別のメンバーが溶液中にある）のいずれかによってマイクロアレイ上で増幅させることによって検出するために選択した。

【0066】

ヒトG3PDH (hG3PDH) の公知の配列に基づいて、4セットのプライマーを設計し、そしてアッセイのために使用した。この4セットのプライマーは、それらのほとんどの3'末端における最後の塩基を除いて同一であるhG3PDH遺伝子配列を有し、ここで、各々のセットは、異なるヌクレオチド、A、T、C、またはGを有する。そのプライマーを固体支持体に添付する際に補助するように、そのプライマーをアミンの5'末端改変と共に合成した。プライマーを、Sigma Chemicals (St. Louis, MO) から購入したシラン処理されたガラススライド上に、異なる濃度で、対または単一プライマーでスポットした。

【0067】

提供されたプライマーを有するシラン処理されたスライドを、室温にて一晩、飽和NaClチャンバ内で水酸化した。水酸化したスライドを、4×SSCで5分間リンスし、次いで、水で洗浄した。そのスライドを、SurModics (Madison, WI) ブロッキング溶液（0.1% SDS含有）で15分間50℃にてブロックし、次いで水で2回リンスし、そして風乾した。次いでそのスライドを使用のために準備した。

【0068】

PCR反応溶液を調製し、dATP、dGTP、およびdTTPの各々を200μM；dCTPを100μMならびにビオチン-14-dCTPを100μMの最終濃度にて得た。この反応溶液はまた、1×Taq反応緩衝液（1.5mM MgCl₂含有）；DNA鋳型としてのヒトG3PDH遺伝子プラスミド（1

00ngファージミドDNAまたは500ng ss-cDNAライブラリー)
 および2.5単位のTaqポリメラーゼ酵素を含む。70 μ lの反応溶液を以下
 のように作製した：

7 μ l	2mM d3TP (dATP、dGTP、およびdTTP)
12.5 μ l	0.4mM dCTP
12.5 μ l	0.4mM ビオチン-14-dCTP
7 μ l	10 \times 反応緩衝液 (15mM MgCl ₂ 含有)
5 μ l	DNA鋳型
25.5 μ l	水
0.5 μ l	5単位/ μ lのTaq DNAポリメラーゼ

(合計70 μ l容量)。

【0069】

HyBaidチャンバ (HyBaid USA, Franklin, MA) を
 、整列した位置が中央に維持されるようにスライド上に置き、そして反応溶液を
 チャンバに移し、そしてプラスチックカバーでシールした。PCR機器を予め暖
 めておき、そして以下の循環プロトコルを適用した：

開始	———94℃	5分間
主なサイクル：(工程1～3) 35回の反復		
	工程1———94℃	30秒間
	工程2———55℃	30秒間
	工程3———72℃	30秒間
最終伸長	———72℃	7分間
終了	———4℃	保持

PCRが終了した後、そのスライドをジギキゲンブロッキング溶液 (Boehringer Mannheim (Indianapolis, Indiana) 由来) で室温にて30分間ブロックした。そのスライドをストレプトアビジン (5 μ g/ μ l) (ジギキゲンブロッキング溶液で1:250希釈) を用いて、穏やかに振盪させながら室温にて30分間染色した。ジギキゲン洗浄緩衝液を使用してそのスライドを室温にて15分間2回洗浄した。そのスライ

ドを、室温にて30分間ジゴキシゲニンブロッキング溶液でブロックした。

【0070】

そのスライドを、ジゴキシゲニンブロッキング溶液で1:100に希釈された第1の抗体(ウサギ抗ストレプトアビジン)で室温にて1時間インキュベートした。そのスライドをジゴキシゲニン洗浄緩衝液を用いて室温にて15分間2回洗浄した。そのスライドを、ジゴキシゲニンブロッキング溶液で1:100に希釈された第2の抗体(Cy3結合ヤギ抗-ウサギ抗体)で室温にて30分間インキュベートした。そのスライドをジゴキシゲニン洗浄緩衝液を用いて室温にて15分間2回洗浄した。そのスライドを、Genetic MicroSystemes, GMS418からのグリーンビーム(green beam)でスキャンした。

【0071】

対称的PCRの結果を図2に示す。50 ngのG3PDH DNAフラグメントをPCR鋳型として使用し、そしてカラム1から6までのプライマー濃度は、それぞれ250、125、62、31、15および7.8 pmol/ μ lであった。PCRをビオチン標識化dCTPの存在下において標準的なプロトコル下で15サイクル実施し、そしてそのシグナルをストレプトアビジンおよびCy3結合抗体を使用して検出した。照射されたスポットは、3'末端のC残基を有する野生型hG3PDHプライマーが固定されているスポットにおけるhG3PDH鋳型の成功した増幅を示す。対照的に、標的hG3PDH鋳型は、異なる3'末端ヌクレオチドを有するhG3PDHプライマーを固定したいずれのスポットにおいても検出不可である。

【0072】

本明細書中に引用される全ての出版物および特許出願は、各々の個々の出版物または特許出願が、その全体において参考として援用されるように具体的にかつ個別に示されてるような場合、本明細書中に参考として援用される。

【0073】

前述の発明は、理解を明瞭にするために例証および例の目的でいくらか詳細に記載されているが、特定の変更および改変が、添付される特許請求の範囲の精神

または範囲から逸脱せずにそれになされ得ることが本発明の技術を考慮すると、当業者に容易に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、固定されたプライマーを用いた、標的ポリヌクレオチドにおいて配列改変を増幅及び検出するための固相増幅方法を模式的に示す。

【図2】

図2は、3'末端での1つのヌクレオチドの相違を有する4セットのプライマーを用いた、ヒトG3PDF遺伝子テンプレートの固相増幅の結果を示す。

【図1】

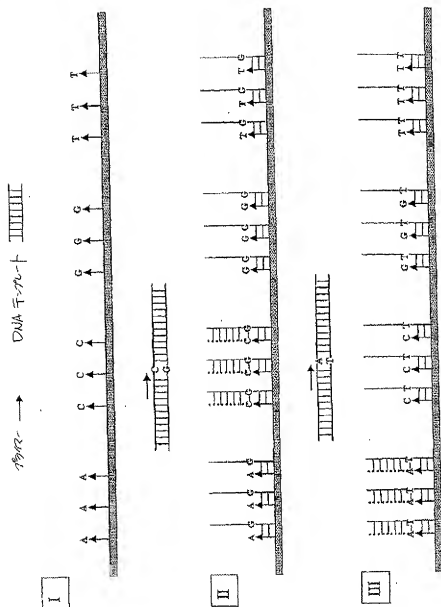
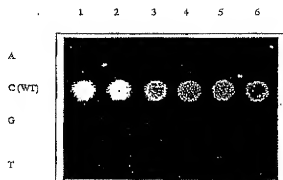


FIGURE 1

【図2】



ハイスループットPCRによる単一の点変異試験。G3PDH遺伝子配列に由来する4セットのオリゴプライマーであって、左の欄に示されるように、それらの3'末端の最後の塩基以外は同一の配列を有するものが、250pmol/ μ l、125pmol/ μ l、62.3pmol/ μ l、31pmol/ μ l、15.5pmol/ μ lおよび7.8pmol/ μ l(1~6欄)の濃度でガラススライド上にそれぞれスポットされた。二本鎖G3PDH DNAフラグメント(50ng)をテンプレートとして使用した。このPCRをピオチン-dCTPの存在下で15サイクルにわたって標準的なプロトコルのもとで行った。このシグナルを、ストレプトアビジンおよびCy3結合体化された抗体により検出した

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Search Application No.
PCT/US 01/09165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system retrieved by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search process (if data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

X	WO 99 39001 A (AMERSHAM PHARM BIOTECH AB ; ULFENDAHL PER JOHAN (SE)) 5 August 1999 (1999-08-05) the whole document	1,8-27
X	WO 98 28438 A (BARNARD ROSS THOMAS ; WALSH TERENCE PATRICK (AU); DIATECH PTY LTD (I) 2 July 1998 (1998-07-02) the whole document	1,8-27
Y	WO 93 17126 A (NEW YORK HEALTH RES INST) 2 September 1993 (1993-09-02) the whole document	1-27
Y	WO 96 31622 A (ISIS INNOVATION ; SOUTHERN EDWIN MELLOR (GB); PRITCHARD CLARE ELIZA) 10 October 1996 (1996-10-10) the whole document	1-27

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of this C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

B earlier document not published on or after the international filing date

C document which may throw doubts on priority claims or which is cited in support of the plaintiff's case of another claim or other special reason (as specified)

D document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

E document published prior to the international filing date but after the priority date claimed

F document published after the international filing date or priority date and not in conflict with this application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention

G document of particular relevance, the disclosure of which cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

H document of particular relevance, the disclosure of which cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, alone or in the context of the art

I document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of this international search report

26 April 2002

08/05/2002

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. Box 5516, D-69115 Mannheim 1
Tel: (+31) 70 340-1000, Fax: (+31) 65 55 55 55
P.O. Box (+31) 70 340-3000

Authorized officer

Hagenmaier, S

Form PCT/ISA/210 (Second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Date of International Search Report

PCT/US 01/09165

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OROSKAR ET AL.: "DETECTION OF IMMOBILIZED AMPLICONS BY ELISA-LIKE TECHNIQUES" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, US, XP002074418 ISSN: 0009-9147 the whole document	1-27
Y	WO 99 32654 A (HITACHI CHEMICAL CO LTD ;MITSUHASHI MASATO (US); HITACHI CHEMICAL) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document	1-27
Y	WO 90 09455 A (GENCO PTY LTD) 23 August 1990 (1990-08-23) the whole document	1-27
Y	LIZARDI P M ET AL.: "MUTATION DETECTION AND SINGLE-MOLECULE COUNTING USING ISOTHERMAL ROLLING-CIRCLE AMPLIFICATION" NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 3, July 1998 (1998-07), pages 225-232, XP002922815 ISSN: 1061-4036 the whole document	1-27
Y	WO 98 36094 A (MOSAIC TECHNOLOGIES) 20 August 1998 (1998-08-20) the whole document	1-27
Y	WO 95 00669 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BAYLOR COLLEGE MEDICINE (US); CASKEY C THOMA) 5 January 1995 (1995-01-05) the whole document	1-27
Y	WO 99 05321 A (TABONE JOHN C ;RAPIGENE INC (US); MOYNIHAN KRISTEN (US); NESS JEFF) 4 February 1999 (1999-02-04) the whole document	1-27
Y	WO 99 29901 A (AUSUBEL FREDERICK M ;GEN HOSPITAL CORP (US); MINORINO MICHAEL (US)) 17 June 1999 (1999-06-17) the whole document	1-27
E	WO 01 34842 A (SIRIZHKOV BORIS N ;MIKHAILOVICH VLADIMIR (US); MIRZABEKOV ANDREI () 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter- national Application No.

PCT/US 01/09165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9939001 A	05-08-1999	AU 3027699 A WO 9939001 A2 EP 1051523 A2 JP 2002501760 T US 6280554 B1	16-08-1999 05-08-1999 15-11-2000 22-01-2002 28-08-2001
WO 9828438 A	02-07-1998	AU 7873898 A WO 9828438 A1	17-07-1998 02-07-1998
WO 9317126 A	02-09-1993	AU 3728093 A CA 2130562 A1 EP 0675966 A1 WO 9317126 A1 US 6322971 B1 US 6103463 A	13-09-1993 02-09-1993 11-10-1995 02-09-1993 27-11-2001 15-08-2000
WO 9631622 A	10-10-1996	EP 0820524 A1 WO 9631622 A1 JP 11503019 T US 6307039 B1 US 6150095 A	28-01-1998 10-10-1996 23-03-1999 23-10-2001 21-11-2000
WO 9932654 A	01-07-1999	EP 1042497 A1 JP 2002505080 T WO 9932654 A1	11-10-2000 19-02-2002 01-07-1999
WO 9009455 A	23-08-1990	AT 181576 T AU 656514 B2 AU 5106990 A WO 9009455 A1 CA 2044591 A1 DK 457824 I3 EP 0457824 A1 ES 2136059 T3 TE 66572 B1 JP 3021036 B2 JP 4503158 T SG 50434 A1 US 5856092 A	15-07-1999 09-02-1995 05-09-1990 23-08-1990 14-08-1990 24-01-2000 27-11-1991 16-11-1999 24-01-1996 15-03-2000 11-06-1992 20-07-1998 05-01-1999
WO 9836094 A	20-08-1998	US 6060288 A AU 6146098 A WO 9836094 A1	09-05-2000 08-09-1998 20-08-1998
WO 9500669 A	05-01-1995	SE 501439 C2 AT 185643 T AU 698553 B2 AU 7212194 A DE 69421277 D1 DE 69421277 T2 EP 0705349 A1 EP 0969103 A2 ES 2141828 T3 JP 9501312 T SE 9302162 A WO 9500669 A1 US 6153379 A	13-02-1995 15-11-1999 29-10-1998 17-01-1995 25-11-1999 31-05-2000 10-04-1996 05-01-2000 01-04-2000 10-02-1997 23-12-1994 06-01-1995 28-11-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on prior art family members

Inventor: *et al.* Application No.

PCT/US 01/09165

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9905321	A	04-02-1999	AU 729134 B2	25-01-2001
			AU 8503298 A	16-02-1999
			CN 1265156 T	30-08-2000
			EP 1000175 A1	17-05-2000
			HU 0002356 A2	28-11-2000
			JP 2001511361 T	14-08-2001
			WO 9905321 A1	04-02-1999
			US 6248521 B1	19-06-2001
			US 2002037510 A1	28-03-2002
WO 9929901	A	17-06-1999	WO 9929901 A1	17-06-1999
WO 0134842	A	17-05-2001	AU 3072101 A	06-06-2001
			WO 0134842 A2	17-05-2001

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁴	識別記号	F I	ターマコード (参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	A F
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	フ、 キアンジン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94552, カストロ バリー、 クロウ クリーク ロード 20499		
Fターム(参考)	4B024 AA11 CA01 CA09 HA13 HA14 HA19 4B029 AA07 AA23 BB20 CC08 FA15 4B063 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR56 QR62 QR82 QS25 QS34 QS36 QX01 QX07		